

Descripción de nuevas tecnologías en la criopreservación de semen ovino

Description of new technologies in the cryopreservation of ram semen

Laura Vanessa Orrego Bedoya¹, Juan Mateo Murillo Muñoz¹, Juan Carlos Echeverry López²

¹ Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Tecnológica de Pereira, ² Docente Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Tecnológica de Pereira

Resumen

Diferentes clases de diluyentes se han utilizado buscando mejorar la calidad del semen congelado. El elevado costo de los reproductores ovinos hace que el acceso a ellos sea difícil para muchos criadores. Una opción es la inseminación artificial. Pero esta depende de diversos factores como la calidad del semen, la criopreservación y el método de inseminación artificial. Los crioprotectores utilizados para conservar y transportar el semen, exponen dicho semen a estrés resultando en daño de los espermatozoides. Adicionalmente, dosis altas de criopreservantes son tóxicas. Siempre se busca encontrar crioprotectores que no afecten en mayor escala a las células y bajar el daño en las mismas. Comercialmente existen en el mercado diluyentes tales como el OviPro® de Minitüb de Alemania, el cual se debe preparar según especificaciones de laboratorio en proporción 1:7:2 (OviPro®: Agua bidestilada apirógena: yema de huevo de gallina). Existen diferentes trabajos donde se combinan los métodos tradicionales con algunas variaciones en su preparación, siempre buscando mejorar la eficiencia en la tasa de preñez. En evaluaciones y comparaciones en mezclas con otros diluyentes como Glicerol, Trehalosa, Etilenglicol y Sacarosa; se ha evaluado la eficacia del glicerol en diferentes aspectos, el más importante la preservación del semen, se encontró que el glicerol combinado con sacarosa y trehalosa es el mejor crioprotector permeable ya que la motilidad progresiva, la viabilidad e integridad acrosomal, la termo resistencia y la integridad de membrana plasmática post descongelamiento fue mejor que con otras mezclas sin importar si se usaba sacarosa o trehalosa. A partir del trabajo investigativo que se ha realizado se concluye que las nuevas técnicas abordadas son positivas y han dado resultados ciertos, pero aun así, estas no cuentan con

estudios científicos suficientes que proporcionen seguridad, efectividad y calidad en el momento de implementarlas. Aunque los resultados han sido satisfactorios, ninguna de las alternativas ha sido lo suficientemente fuertes para que hayan sido implementadas de una manera comercial.

Palabras clave: Diluyente, fertilidad, reproducción.

Abstract

Different kinds of diluents have been used to improve the quality of frozen semen. The high cost of sheep breeders makes access to them difficult for many breeders. One option is artificial insemination. But this dependence on various factors such as semen quality, cryopreservation and artificial insemination method. Cryoprotectants used to conserve and transport semen expose said semen to stress resulting from sperm damage. In addition, high doses of cryopreservatives are toxic. It always seeks to find cryoprotectants that do not affect the cells on a larger scale and reduce the damage in them. Commercially available diluents such as the OviPro® from Germany's Minitüb, which must be prepared according to laboratory specifications in 1: 7: 2 ratios (OviPro ©: Bi-distilled water, pyrogenic: chicken egg yolk). There are different works where traditional methods are combined with some variations in their preparation, always seeking to improve efficiency in the pregnancy rate. In evaluations and comparisons in mixtures with other diluents such as Glycerol, Trehalose, Ethylene Glycol and Sucrose; The efficacy of glycerol has been evaluated in different aspects, the most important semen preservation, it was found that glycerol combined with sucrose and trehalose is the best permeable cryoprotectant and progressive motility, acrosomal viability and integrity, thermo resistance and Post-defrosting plasma membrane integrity was better than with other mixtures regardless of whether sucrose or trehalose was used. From the research work that has been carried out, it is concluded that the new techniques addressed are positive and have given specific results, but still, they do not have specific scientific studies that provide safety, risk and quality at the time of implementing them. Although the results have been satisfactory, none of the alternatives have been strong enough to have been implemented in a commercial manner.

Key words: diluent, fertility, reproduction.

Introducción

La evaluación de semen ovino por diferentes técnicas ha estado a la par con técnicas utilizadas en diferentes especies. Diferentes clases de diluyentes se han utilizado buscando mejorar la calidad del semen congelado (1).

Numerosos factores afectan la fertilidad en ovinos. La edad, forma del cérvix, técnicas de inseminación artificial influyen en las tasas de preñez (2).

El objetivo del presente trabajo fue describir la implementación de nuevas tecnologías en la criopreservación de semen ovino.

Materiales y métodos

Se utilizaron bases de datos electrónicas como Science Direct, Scopus, Scielo y Google Académico. La búsqueda se limitó a información del año 2010 hasta el presente. Se emplearon los conectores and, or y not.

Inseminación artificial en ovinos

El elevado costo de los reproductores ovinos hace que el acceso a ellos sea difícil para muchos criadores. Una opción es la inseminación artificial. Pero esta depende de diversos factores como la calidad del semen, la criopreservación y el método de inseminación artificial (3).

Algunos estudios sugieren que una mejor opción para preservar semen en vez de la congelación es la vitrificación, porque tiene resultados un poco mejores y el proceso se puede hacer de manera más sencilla, más económica y en cualquier laboratorio disponible (4).

El mejoramiento genético tiene como una de sus bases la inseminación artificial. Esta se realiza con semen fresco, refrigerado y congelado. La conservación del semen permite un uso más eficiente del semen ovino (5).

Todas las poblaciones de espermatozoides tienen una heterogeneidad y por lo tanto tienen muchas variables y una de ellas es la motilidad, lo que significa que algunas células de espermatozoides tienen mayor fertilidad en comparación con otros (6).

Sin embargo, existen diferentes factores que inciden en el éxito de la inseminación artificial. La edad de las hembras es el principal, pero también hay otros factores como la técnica de inseminación artificial, la forma del cérvix y la presentación del semen (2). Así mismo, hay factores que afectan la calidad del semen a congelar, tales como flujo sanguíneo, volumen testicular, cantidad de hormonas esteroideas y calidad del semen (7).

Los crioprotectores utilizados para conservar y transportar el semen, exponen dicho semen a estrés resultando en daño de los espermatozoides. Adicionalmente, dosis altas de criopreservantes son tóxicas. Siempre se busca encontrar crioprotectores que no afecten en mayor escala a las células y bajar el daño en las mismas. Estos crioprotectores se pueden dividir en permeables y no permeables según su capacidad de penetrar al interior del embrión o no. El más común de los permeables es el glicerol y de los no permeables azúcares y proteínas. Se debe adicionar leche desnatada o yema de huevo a estos diluyentes para minimizar el daño celular (8).

No todos los tipos de células pueden criopreservarse con un método estándar, es por eso que se realizan diferentes estudios para seleccionar los métodos adecuados (8).

Comercialmente existen en el mercado diluyentes tales como el OviPro® de Minitüb de Alemania, el cual se debe preparar según especificaciones de laboratorio en proporción 1:7:2 (OviPro®: Agua bidestilada apirógena: yema de huevo de gallina) (5).

La yema de huevo hace parte de la mayoría de preparaciones para conservar el semen. Se ha empleado yema de huevo fresco y yema liofilizada sin encontrar diferencias entre ambos (9).

La inseminación artificial brinda un cuidado adecuado a los reproductores, debido a que no son transportados, lo que evita someter al animal a cambios climáticos y a cambios alimenticios que pueden llegar a generar altos niveles de estrés en el

reproductor, por lo tanto la inseminación disminuye el riesgo físico y sanitario que puede perjudicar la calidad espermática (5).

Para la selección de los reproductores se deben tener en cuenta características específicas para lograr objetivos de producción eficientes; es menester evaluar el estado sanitario de los animales realizando un análisis clínico completo (10).

La inseminación artificial ovina es una técnica que ha implementado el hombre para buscar el progreso genético y mejorar el control sanitario, en este procedimiento se obtiene semen del macho para ser introducido en el aparato reproductor de la hembra (11).

Variables tecnológicas

Existen diferentes trabajos donde se combinan los métodos tradicionales con algunas variaciones en su preparación, siempre buscando mejorar la eficiencia en la tasa de preñez.

Aunque lo que se busca con la criopreservación es almacenar el semen por mucho tiempo, el proceso de congelado y descongelado provoca lesiones en el espermatozoide. La formación de hielo en el interior de la célula durante el congelado, es la principal causa de daño espermático (12).

Crioprotectores de bajo peso molecular como glicerol, DMSO, etilenglicol y 1,2propanediol se han utilizado con diferentes resultados. El glicerol dio mejor resultado en motilidad y en integridad de la membrana (12).

Se han realizado trabajos con diluyentes hipertónicos como trehalosa y lactosa. Siempre utilizando una base de Tris, con ácido cítrico, fructosa, glicina, yema de huevo y glicerol. El semen congelado con trehalosa obtuvo mejor resultado luego del descongelado, por tener mejor motilidad individual y mayor cantidad de espermatozoides vivos (13).

En evaluaciones y comparaciones en mezclas con otros diluyentes como glicerol, trehalosa, etilenglicol y sacarosa; se ha evaluado la eficacia del glicerol en diferentes aspectos, el más importante la preservación del semen, se encontró que el glicerol combinado con sacarosa y trehalosa es el mejor crioprotector permeable ya que la

motilidad progresiva, la viabilidad e integridad acrosomal, la termo resistencia y la integridad de membrana plasmática post descongelamiento fue mejor que con otras mezclas sin importar si se usaba sacarosa o trehalosa. Es una de las mejores opciones para preservar semen ovino (14).

Nuevas tecnologías

Para la conservación del semen se necesitan una serie de requerimientos como ofrecer nutrientes y fuentes de energía; al momento de utilizarlos permitiendo la resistencia a su almacenamiento, ya que de esto depende la calidad del semen en cuanto a la supervivencia y a la capacidad de fecundar, en cuanto a las nuevas técnicas como el agua de coco en comparación con el tris (hidroximetil amino metano), se encontró que el TRIS es mejor diluyente debido a que en el proceso de descongelación espermática proporciona mayor conservación.

El agua de coco en combinación con el suero fetal bovino tiene un mayor rendimiento en cuanto a la dilución y preservación espermática en comparación del agua de coco con aloe vera (15).

La leche de soya es otro compuesto que se ha evaluado para ser usado como crioprotector, en este caso se estudiaron mezclas de leche de soya con glicerol y dimetilformamida DMF; ya se han descrito las cualidades del glicerol y en este estudio se demostró que la mezcla de glicerol con leche de soya es la ideal para la criopreservación del semen, ya que en la mezcla de leche de soya con dimetilformamida DMF demostró mayor motilidad en el momento de descongelar pero dos horas después disminuía la integridad de la motilidad y el acrosoma (16).

El iodixanol es un compuesto a base de yodo utilizado en medicina humana con fines diagnósticos en radiología como medio de contraste. Se utilizó en mezcla con base Tris y se comprobó que aumenta la supervivencia de los espermatozoides después de la descongelación. Esto debido a que protegió la motilidad progresiva, la integridad de la membrana, la integridad del acrosoma y la morfología. Se utilizaron varias concentraciones siendo la de mejor resultado en combinación al 5 % (17).

La dimetilacetamida (DMA) es un compuesto químico utilizado a nivel de laboratorio y farmacéutico, en la industria textil y en la síntesis de pesticidas. Se realizó un

estudio utilizando el DMA a concentraciones del 3 % y 6 %, comparándolo con el glicerol y trehalosa. El de mejor resultado en el semen descongelado fue el glicerol. Sin embargo, el DMA al 3 % puede ser utilizado como criopreservante sin alterar las tasas de fertilidad (18).

El uso de aceites de semillas ha incrementado en los últimos años gracias a todos los usos que tienen y beneficios que ofrece; en el estudio realizado se centró en la efectividad que tiene el aceite de semilla de cactus en cuanto a los parámetros de calidad del semen en el almacenamiento, combinándolos con yema de huevo tris y leche descremada. En el estudio se encontró que agregando 1% o 2% de semilla de cactus se aumentan los parámetros de calidad espermática y se disminuye el nivel de peroxidación y fragmentación del ADN durante su almacenamiento (19).

El ácido oleico es un ácido graso monoinsaturado perteneciente a los omegas 9, está presente en el aceite de oliva y canola, en este trabajo se buscó evaluar si el enriquecimiento del semen ovino con ácido oleico tendría un efecto positivo en la refrigeración. Se encontró como resultado que el uso de ácido oleico con dosis de 0,5 y 1mm mejoraron la calidad del semen durante el almacenamiento refrigerado entre las 48 y 72 horas, aumento en motilidad, viabilidad e integridad de la membrana (20)

El DHA (ácido docosahexaenoico) es un ácido graso esencial que favorece el desarrollo cerebral y de la visión, se encuentra en aceites de pescado y nueces. Se realizó un estudio para mejorar la calidad del semen después de ser descongelado aumentando la concentración de DHA utilizando aceite de pescado en concentraciones de (0.15, 0.30 y 0.45 g) por gramo de yema de huevo. Los resultados mostraron que aumentar el DHA puede mejorar la calidad seminal, movilidad progresiva, viabilidad e integridad de las membranas y la fertilidad después de la descongelación (21).

Conclusiones

A partir del trabajo investigativo que se ha realizado se concluye que las nuevas técnicas abordadas son positivas y han dado resultados ciertos, pero aun así, estas no cuentan con estudios científicos suficientes que proporcionen seguridad, efectividad y calidad en el momento de implementarlas. Aunque los resultados han sido satisfactorios, ninguna de las alternativas ha sido lo suficientemente fuertes para que hayan sido implementadas de una manera comercial.

Recomendaciones

Se recomienda seguir estudiando e implementando nuevos diluyentes, para aumentar los factores de mejoramiento en los parámetros de la calidad espermática en ovinos, y que a su vez sean de un uso más práctico para ser implementados en productos comerciales.

Bibliografía

1. Tsakmakidis IA. Ram semen evaluation : Development and efficiency of modern techniques. Small Rumin Res [Internet]. 2010;92(1–3):126–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2010.04.017>
2. Cáceres Bautista D. Factores que dificultan la inseminación artificial en la especie ovina y su correlación con las tasas de fertilidad, preñez y parto. Universidad Cooperativa de Colombia; 2019.
3. Angulo Domínguez, Alex R.; Angulo Domínguez EF. Estudio comparativo de dos sistemas de congelamiento de semen y su efecto sobre la fertilidad en ovinos, Centro Experimental Casaracra. 2018.
4. Ambriz-garcía DA, Rodríguez-suástegui JL. Ventajas de la vitrificación con relación a la congelación en eyaculados de ovino. 2018;40(1):1–8.
5. Cueto M. Inseminación artificial a tiempo fijo con semen ovino refrigerado. 2009;277(8400):435–40.
6. Ledesma A, Zalazar L, Fernández-alegre E, Hozbor F. Seminal plasma proteins modify the distribution of sperm subpopulations in cryopreserved

- semen of rams with lesser fertility. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2017;184(June):44–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.06.015>
7. Hedia MG, El-belely MS, Ismail ST, El-maaty AMA. Monthly changes in testicular blood flow dynamics and their association with testicular volume , plasma steroid hormones profile and semen characteristics in rams. *Theriogenology* [Internet]. 2019;123:68–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.09.032>
 8. Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim Reprod Sci* [Internet]. 2016;169:2–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.004>
 9. Alcay S, Toker MB, Gokce E, Ustuner B, Onder NT, Sagirkaya H, et al. Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. *Cryobiology* [Internet]. 2015;71(2):329–33. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.08.008>
 10. Cueto M, Gibbons A, Bruno Galarraga MM, Fernández J. Manual de obtención, procesamiento y conservación del semen ovino Segunda edición [Internet]. 2011. Available from: https://inta.gob.ar/sites/default/files/inta-manual_de_semen_ovino_2da_edicion.pdf
 11. Latorre, Etel L; Salez Z. FA. Inseminación artificial ovina en la XII región - 1 Parte. Chile; 2000.
 12. Alcay S, Ustuner B, Nur Z. Effects of low molecular weight cryoprotectants on the post-thaw ram sperm quality and fertilizing ability. *Small Rumin Res* [Internet]. 2016;136:59–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.01.009>
 13. Guerrero V. H, Huanca L. W, Raymundo T. F, Huerta O. S, Ramos D. D. Uso de dilutores hipertónicos en la criopreservación de semen ovino. *Rev Investig Vet del Perú*. 2015;20(1):41–6.
 14. Sandoval R, Santiani A, Ruiz L, Leyva V, Coronado L, Delgado A.

- Criopreservación de semen ovino empleando tres dilutores y cuatro combinaciones de agentes crioprotectores permeantes y no permeantes. *Rev Investig Vet del Perú* [Internet]. 2007;18(2):107–14. Available from: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/veterinaria/article/view/1285>
15. Reyes WC. Agua de coco (*Cocus nucifera*), suero fetal bovino, aloe vera y sus combinaciones para la criopreservación de semen ovino. 2005; Available from: <http://eprints.uach.mx/117/1/ZOO-TP-00051.pdf>
 16. Blas I De, Jerez R, González N, Olaciregui M, Lu V, Gil L. Use of soy milk combined with different cryoprotectants for the ram semen cryopreservation. 2016;134:34–8.
 17. Cirit Ü, Ba H, Varis Ö, Clifford-rathert C. Comparison of cryoprotective effects of iodixanol , trehalose and cysteamine on ram semen. 2013;139:38–44.
 18. Bittencourt RF, Oba E, Emanuel C, Biscarde DA, Costa H, Vasconcelos M, et al. Dimethylacetamide and trehalose for ram semen cryopreservation. *Cryobiology* [Internet]. 2018;85(November):1–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2018.10.266>
 19. Allai L, Druart X, Louanjli N, Contell J, Nasser B, El B. Improvements of ram semen quality using cactus seed oil during liquid preservation in Tris egg yolk and skim milk based extenders &. *Small Rumin Res* [Internet]. 2017;151:16–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.02.001>
 20. Zadeh E, Haddad R, Eslami M. Evaluation of ram semen enrichment with oleic acid on different spermatozoa parameters during low temperature liquid storage. *Small Rumin Res* [Internet]. 2017;150:30–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.03.002>
 21. Abdi-benemar H, Jafaroghli M, Khalili B, Zamiri MJ, Ezazi H, Shadparvar AA. Effects of DHA supplementation of the extender containing egg yolk and α -tocopherol on the freezability and post-thawing fertility of ram semen. *Small Rumin Res* [Internet]. 2015;130:166–70. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.06.013>